

39

POWERED BY **Dialog**

Cytoplasmatic expression in E. coli of antibodies, antibody fragments and fusions thereof
Cytoplasmatische Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperfragment-Fusionsmolekulan in E. coli

Expression cytoplasmique dans E. coli des anticorps, fragments d'anticorps et fusions de ceux-ci

Assignee:

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, (200264), Postfach 80 03 20, 65926 Frankfurt am Main, (DE), (Proprietor designated states: all)

Inventor:

Opper, Martin, Dr., Stumpelstal 25, D-35041 Marburg, (DE)
 Bosslet, Klaus, Dr., An der Haustatt 64, D-35037 Marburg, (DE)
 Czech, Jorg, Dr., Kreutzacker 2a, D-35041 Marburg, (DE)

Legal Representative:

Fischer, Hans-Jurgen, Dr. et al (70771), Aventis Pharma Deutschland GmbH, Patent- und Lizenzabteilung, 65926 Frankfurt am Main, (DE)

Patent

Country Code/Number	Kind	Date
EP 737747	A2	October 16, 1996 (Basic)
EP 737747	A3	March 28, 2001
EP 737747	B1	June 11, 2003

Application

Country Code/Number	Date
EP 96103913	March 13, 1996

Priority Application Number (Country Code, Number, Date): DE 19513676 (950411)

Designated States: AT; BE; CH; DE; DK; ES; FR; GB; GR; IE; IT; LI; LU; NL; PT; SE

International Patent Class: C12N-015/13; C12N-015/62; C12N-009/24

Cited Patents (EP B): EP 501215 A; EP 590530 A

Cited References (EP B):

- K. BOSSLET ET AL.: "Molecular and functional characterisation of a fusion protein suited for tumour specific prodrug activation." BRITISH JOURNAL OF CANCER, Bd. 65, Nr. 2, Februar 1992 (1992-02), Seiten 234-238, XP002092531 Basingstoke, Grossbritannien
- A. PLUCKTHUN ET AL.: "Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in Escherichia coli." METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 178, 1989, Seiten 497-515, XP002024991 New York, NY, VSA
- M. RODRIGUES ET AL.: "Development of a humanized disulfide-stabilized anti-p185HER2 Fv-

- beta-lactamase fusion protein for activation of a cephalosporin doxorubici prodrug." *CANCER RESEARCH*, Bd. 55, Nr. 1, 1. Januar 1995 (1995-01-01), Seiten 63-70, XP002159150 Baltimore, MD, VSA
- H. HAISMA ET AL.: "A monoclonal antibody-beta-glucuronidase conjugate as activator of the prodrug epirubicin-glucuronide for specific treatment of cancer." *BRITISH JOURNAL OF CANCER*, Bd. 66, Nr. 3, September 1992 (1992-09), Seiten 474-478, XP000882039 Basingstoke, Grossbritannien
 - A. DERMAN ET AL.: "Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*." *SCIENCE*, Bd. 262, Nr. 5140, 10. Dezember 1993 (1993-12-10), Seiten 1744-1747, XP002159151 Washington, DC, VSA
 - M. HE ET AL.: "Functional expression of a dingle-chain anti-progesterone antibody fragment in the cytoplasm of a mutant *Escherichia coli*." *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, Bd. 23, Nr. 19, 11. Oktober 1995 (1995-10-11), Seiten 4009-4010, XP002159152 Oxford, Grossbritannien
 - K. PROBA ET AL.: "Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: influence of thioredoxin reductase (TrxB)." *GENE*, Bd. 159, Nr. 2, 4. Juli 1995 (1995-07-04), Seiten 203-207, XP004042207 Amsterdam, die Niederlande

Abstract: EP 737747 A2 (Translated)

Prodn. of recombinant antibody (Ab), Ab fragment or Ab/enzyme fusion protein

Prodn. of recombinant antibodies (Ab), Ab fragments or Ab fragment/enzyme fusion proteins, where the enzyme is a cytoplasmic mammalian or *E. coli* enzyme, is effected using a thioredoxinreductase deficient *E. coli* strain, the expression prods. being isolated from the cytoplasm. Also claimed are: (1) Ab fragment/enzyme fusion protein in which the enzyme is *E. coli* (beta)-glucuronidase; and (2) gene encoding the fusion protein of (1).

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 737 747 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
16.10.1996 Patentblatt 1996/42

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/13**, C12N 15/62,
C12N 9/24

(21) Anmeldenummer: 96103913.8

(22) Anmeldetag: 13.03.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE

(30) Priorität: 11.04.1995 DE 19513676

(71) Anmelder: **BEHRINGWERKE AG**
35001 Marburg (DE)

(72) Erfinder:

- **Opper, Martin, Dr.**
D-35041 Marburg (DE)
- **Bosslet, Klaus, Dr.**
D-35037 Marburg (DE)
- **Czech, Jörg, Dr.**
D-35041 Marburg (DE)

(54) **Cytoplasmatische Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperfragment-Fusionsmolekülen in E. coli**

(57) Die Erfindung betrifft die cytoplasmatische Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperfragmentfusionsmolekülen in E. coli. Insbesondere Antikörperfragmentfusionsmoleküle mit einem gegen Tumore gerichteten Antikörperteil und einem eine untoxische "Prodrug" in die toxische "Drug" spaltenden Enzymteil sind so unter Beibehaltung der jeweiligen funktionellen Eigenschaften günstig herstellbar.

EP 0 737 747 A2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die cytoplasmatische Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperfragmentfusionsmolekülen in *E. coli*. Insbesondere Antikörperfragmentfusionsmoleküle mit einem gegen Tumore gerichteten Antikörperteil und einem eine untoxische "Prodrug" in die toxische "Drug" spaltenden Enzymteil sind so unter Beibehaltung der jeweiligen funktionellen Eigenschaften günstig herstellbar.

Die Expression von Antikörpern oder Antikörperfragmenten unter Erhalt ihrer antigenbindenden Eigenschaft gelang bisher in *E. coli* nur unter Verwendung von Signalsequenzen, die den Transport ins Periplasma steuern. Die Expressionsausbeuten bewegen sich bei der periplasmatischen *E. coli* Expression im Bereich von wenigen µg/l Kulturmedium (Ayala et al., *Bio Techniques* 13, S. 790 - 799, 1992). Außerdem sind oft Rückfaltungsversuche notwendig, um funktionell aktive Antikörperfragmente (Fab) oder Antigenbinderegionen (sFv) zu gewinnen.

Es bestand daher weiterhin das Bedürfnis, bessere Methoden zur Expression von funktionell aktiven Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten zu entwickeln. In Zusammenhang mit dem ADEPT Konzept (Bagshawe, *Br.J. Cancer*, Vol. 60, pp 275 - 281, 1989) sollten diese verbesserten Methoden auch auf Antikörperfragmentenzymfusionsmoleküle, speziell auf Fusionsproteine mit cytoplasmatischen Säuger- oder *E. coli*-Enzymen wie z. B. die *E. coli* β -Glucuronidase anwendbar sein.

Die β -Glucuronidase von *Escherichia coli* ist biochemisch und genetisch gut untersucht. Das Gen (*uid A*) wurde von Jefferson et al. (*PNAS* Vol. 83, pp 8447 - 8451, 1986) kloniert und als Reportergen für heterologe Kontrollregionen eingesetzt.

β -Glucuronidase (β -D-Glucuronid Glucuronosohydrolase, E.C. 3.2.1.31) stellt eine saure Hydrolase dar, die die Spaltung von β -Glucuroniden katalysiert. Da die Säuger-Glucuronidasen intensiv untersucht wurden, sind vielerlei Substanzen für histologische, spektrophotometrische sowie fluorometrische Analysen verfügbar. Neue, zusätzliche Bedeutung hat dieses Enzym in der Verwendung für Fusionsproteine zur gezielten Tumorthherapie erlangt. Dabei wird die humane Glucuronidase in Form eines Fusionsproteins mit Antikörpern/Antikörperfragmenten bzw. Antigenbinderegionen verwendet (Bosslet et al., *Br.J. Cancer*, 65, 234 - 238, 1992). Alternativ zum humanen Enzym ist auch der Einsatz der homologen *E. coli* β -Glucuronidase möglich. Unter anderem hat die *E. coli*- β -Glucuronidase den Vorteil, daß ihre katalytische Aktivität bei physiologischem pH signifikant höher ist als die der humanen β -Glucuronidase.

Antikörperfragmentenzymfusionsmoleküle konnten bisher nur periplasmatisch in *E. coli* exprimiert werden. Der dabei verwendete Enzymanteil besteht daher stets aus periplasmatischen *E. coli*-Enzymen wie z. B. β -Lactamase (Goshorn et al., *Canc. Res.* 53, 2123 - 2117, 1993).

Die Expression eines Antikörperfragmentenzymfusionsmoleküls unter Verwendung eines cytoplasmatischen *E. coli* Enzyms wie der β -Glucuronidase war in funktionell aktivem Zustand, d. h. unter Beibehaltung von enzymatischer Aktivität - wie auch Antigenbindungsfähigkeit des. Antikörperanteils - bisher nicht möglich. Die funktionell aktive Expression von den meisten Antikörpern bzw. Antikörperfragmentmolekülen erfordert in der Regel definierte Signalsequenzen zum Export der exprimierten Moleküle via endoplasmatischem Retikulum in das Kulturmedium (Animalzellen und Hefen) bzw. in das Periplasma (*E. coli*). Nur im endoplasmatischen Retikulum bzw. im Periplasma herrschen die notwendigen oxidativen Bedingungen zur Ausbildung der für die funktionelle Aktivität wichtigen Disulfidbrücken. Außerdem ist der sekretorische Syntheseweg oft für die korrekte dreidimensionale Faltung des exprimierten Proteins entscheidend.

Ein bezüglich Thioredoxinreduktase defizienter *E. coli* Stamm, z. B. der Stamm AD 494, kann Disulfidbrücken im Cytoplasma ausbilden und erlaubt so die intrazelluläre Expression von natürlicherweise sekretorischen Enzymen, wie z. B. alkalischer Phosphatase (Derman et al, *Science*, Vol. 262, 1744 - 1747, 1993).

Es wurde nun gefunden, daß sich ein Fab-Molekül wie z. B. des MAK BW 431/26 funktionell aktiv, d. h. unter Beibehaltung der Antigenbindungseigenschaften in einem bezüglich Thioredoxinreduktase defizienten *E. coli* Stamm cytoplasmatisch exprimieren läßt, ebenso auch kompletter Antikörper.

Überraschenderweise konnte überdies ein Antikörperfragmentenzymfusionsmolekül bestehend aus beispielsweise dem cytoplasmatischen, nicht disulfidverbrückten *E. coli*-Enzym β -Glucuronidase und z. B. dem Fab BW 431/26, der seinerseits intramolekulare Cystinbrücken zur korrekten Faltung benötigt (Fab BW 431/26-*E. coli*- β -Glucuronidase) im Cytoplasma exprimiert und daraus in funktioneller Form isoliert werden. Dabei war das exprimierte Molekül löslich und keine Rückfaltungsversuche notwendig. Damit eröffnen sich neue Möglichkeiten zur wirtschaftlichen Produktion von Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperfragmentenzymfusionsmolekülen für die therapeutische und diagnostische Anwendung.

Die Erfindung betrifft daher Verfahren zur gentechnischen Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten oder Antikörperfragmentfusionsmolekülen mit cytoplasmatischen Säuger- oder *E. coli*-Enzymen als Fusionspartner mittels thioredoxinreduktase-defizienter *E. coli* Stämme und nachfolgender Isolierung der Expressionsprodukte aus dem Cytoplasma. Antikörperfragmente sind dabei bevorzugt Fab-Fragmente oder auch Antigenbinderegionen (sFv, Plückthun und Skerra, *Meth. Enzymol.* 178, S. 497 - 515, 1991). Besonders bevorzugt sind schließlich Antikörperfragmentenzymfusionsproteine mit cytoplasmatischen *E. coli*-Enzymen als Fusionspartner, ganz bevorzugt mit *E. coli*- β -Glucuronidase als Fusionspartner.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

5 Konstruktion eines dicistronischen Expressionsvektors ohne Signalsequenzen

A) Klonierung der E.coli- β -Glucuronidase aus E.coli RR1:

10 Mit den Primern E.c. β Gluc. for und E.c. β Gluc. back wurde die für E.coli β -Glucuronidase kodierende DNA-Sequenz aus dem E.coli Stamm RR1 mittels PCR amplifiziert und über Xba I/Hind III in den Vektor KS kloniert (Fig. 1).

B) Klonierung von VH/CH1 und Linker(Verbindungsstück) MAK BW 431/26 vor E.coli- β -Glucuronidase:

15 Mit den Primern Fab HC for und Fab HC back wurde aus einem vorhandenen cDNA-Konstrukt HC-hum- β -Glucuronidase mittels PCR die variable Domäne VH und die konstante Domäne CH1 amplifiziert und über Xba I/Eco RI in den Vektor KS kloniert (Fig. 2). Nach Verifizierung der DNA-Sequenz wurde ein über Xba I/Nco I Verdau gewonnenes DNA-Fragment in den mit XbaI/NcoI geschnittenen Vektor aus Klonierungsschritt A ligiert (Fig. 3).

C) Klonierung des Fab BW 431/26 E.coli- β -Glucuronidase in pTrc 99:

20 Zu der in dem Expressionsvektor pTrc99 (Amann et al, Gene 69, 301, 1988) vorhandenen leichten Kette des MAK BW 431/26 wurde ein Xba I/Hind III Fragment ligiert, das die korrespondierende schwere Kette fusioniert an die E.coli- β -Glucuronidase enthält (Fig. 4). Das entstandene Konstrukt hat die Struktur: Promotor (trc) - Shine Dalgarno Sequenz (SD) - VK/CK MAK BW 431/26 - SD - VH/CH1 MAK BW 431/26 - E.coli- β -Gluc. - Transskriptions-Terminationssignal (Fig. 5).

25 Beispiel 2

Expression in AD 494

30 Übernacht-Kulturen des in Beispiel 1 beschriebenen pTrc dicistr. Fab-E.coli- β -Gluc. in AD 494 wurden 1:10 verdünnt und bei 25 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 inkubiert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG für 19 - 22 Stunden wurden die Zellen 1-1,5 Stunden auf Eis inkubiert. Nach Pelletierung und Resuspendierung der Zellen in 10 ml PBS, pH 7,2 pro Liter Kulturvolumen in der French Press bei 1000 - 1500 Psi aufgebrochen. Der Zellaufbruch wurde bei 20.000 rpm im SS-34 Rotor geklärt und der Überstand für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

35 Beispiel 3

Affinitätschromatographische Reinigung des Fusionsmoleküls

40 Der über 2 μ m Filter geklärte Zellaufbruchsüberstand wurde über die Bindung des Fusionsproteins an einen antidiotypischen monoklonalen Antikörper (BW 2064(34) affinitätschromatographisch gereinigt (6 mg MAK/ml CnBr-aktivierter Sepharose 4B). Das an die Affinitätssäule gebundene Fusionsprotein wurde über pH-Wert Shift (pH 7,2 - pH 5,0) eluiert. Mittels Ultrafiltration erfolgte anschließend die Konzentrierung des Eluats (Filtron Macrosep. Omega NMWL:30 KD). Im SDS-PAGE wurden Zellaufbruchüberstand, Durchfluß, ankonzentriertes Eluat und Filtrat der Ultrafiltration analysiert. Die bei etwa 97 KD auftretende Bande entspricht molekulargewichtsmäßig dem erwarteten Fusionsprotein aus dem Schwerkettenanteil des Antikörpers und der E.coli Glucuronidase. Die bei etwa 70 KD auftretende Bande repräsentiert endogene β -Glucuronidase, die über die Bildung von Heterotetrameren (s. u.) zwischen exprimierter schwerer Kette/ β -Glucuronidase und endogener β -Glucuronidase bei der Affinitäts-chromatographie mitgereinigt worden ist.

50 Beispiel 4

TSK-3000 Gelchromatographie

55 In der TSK 3000 Gelchromatographie wurde das native Molekül untersucht und das Molekulargewicht mit 450 KD bestimmt. Da die Glucuronidase im nativen Zustand ein Tetramer bildet, entspricht das beobachtete dem theoretisch zu erwartenden Molekulargewicht. Im folgenden wird dieser Schritt im einzelnen beschrieben.

Von einem über Antidiotyp affinitätsgereinigtem Fusionsprotein wurden 400 ng in 25 μ l auf einer TSK Gel G 3000 SW XL Säule (TOSO HAAS, Best. Nr. 3.5WxN3211, 7,8 mm x 300 mm) in einem geeigneten Laufmittel (PBS, pH 7,2, 5 g/l Maltose, 4,2 g/l Arginin) mit einer Flußrate von 0,5 ml/min. chromatographiert. Die Merck Hitachi HPLC-Anlage (L-

EP 0 737 747 A2

400 UV-Detektor, L-6210 Intelligent pump, D-2500 Chromato-Integrator) wurde mit etwa 20 bar betrieben, die optische Dichte des Eluats wurde bei 280 nm bestimmt und mittels eines LKB 2111 Multisac Fraktionssammlers 0,5 ml Fraktionen gesammelt, die anschließend im Spezifitätsenzymaktivitätstest (Beispiel 5) einer Analyse unterworfen wurden. Das Experiment ist in Fig. 6 dargestellt. Basierend auf den mittels Pfeilen markierten Molekulargewichtspositionen von

Beispiel 5

Nachweis der Antigenbindungseigenschaften und der enzymatischen Aktivität

Die Fähigkeit des Fab-E.coli- β -Glucuronidase Fusionsproteins spezifisch an das durch den MAK 431/26 definierte Epitop auf CEA (Carcino Embryonales Antigen) zu binden und gleichzeitig die enzymatische Aktivität der β -Glucuronidase auszuüben, wurde in einem Spezifitäts-Enzymaktivitätstest gezeigt (EP-A-0 501 215 A2, Beispiel J). Der Test bestimmt die Freisetzung von 4-Methylumbelliferon aus 4-Methylumbelliferyl- β -Glucuronid durch den β -Glucuronidase-anteil des Fusionsproteins, nachdem das Fusionsprotein über den Fab-Anteil an das Antigen gebunden ist. Die ermittelten Fluoreszenzwerte werden als relative Fluoreszenzeinheiten (FE) angegeben (Tab. 1). Der Test zeigt eine signifikante Methylumbelliferon Freisetzung durch das Fusionsprotein bei den mit CEA beschichteten Platten.

Als Kontrolle dienten mit PEM (polymorphic epithelial mucin) beschichteten Platten. Das Fluoreszenzsignal war dort stets kleiner 30 FE.

Tab. 1

	1 : 2	1: 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1: 128	1: 256
FE Zellaufbruchsüberstand 1:3	8183	8149	7531	6631	4560	2509	1019	421,9
FE Durchfluß 1:1	6548	5231	3222	1477	525,2	214	86,19	46,29
FE Eluat pH 5,0 1:3	7782	7571	6360	4239	1983	815,7	302	113,9
FE Eluat pH 5,0 Ultrakonzent. 1:10	7904	8106	8036	7153	5802	3618	1651	665,7
FE Eluat pH 5,0 Ultrafiltrat 1:1	74,65	172,7	90,23	52,30	38,84	25,79	23,51	19,39

Patentansprüche

- Verfahren zur gentechnischen Expression von Antikörpern, Antikörperfragmenten oder Antikörperfragmentenzymfusionsmolekülen mit cytoplasmatischen Säuger- oder E.coli Enzymen als Fusionspartner, dadurch gekennzeichnet, daß Thioredoxinreduktase defiziente E.coli Stämme eingesetzt werden und die Expressionsprodukte aus dem Cytoplasma isoliert werden.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Fab-Fragmente oder Antigenbinderegionen (sFv) exprimiert werden.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikörperfragmentenzymfusionsmolekül im Antikörperteil gegen Tumorzellen gerichtet ist und der Enzymteil in der Lage ist, untoxische "Prodrugs" in toxische "Drugs" zu spalten.
- Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörperteil humanisiert wurde und der Enzymteil ein humanes cytoplasmatisches Enzym ist.
- Antikörperfragmentenzymfusionsprotein, dadurch gekennzeichnet, daß E.coli- β -Glucuronidase Fusionspartner ist.
- Gen codierend für ein Fusionsprotein nach Anspruch 5.

FIG. 1

E.c. β -Gluc for: 5' AAG CTT TCA TTG TTT GCC TCC CTG CTG CGG 3'

E.c. β -Gluc back: 5' TCT AGA CCA TGG TAC GTC CTG TAC AAA CCC CA 3'



PCR + Klonierung in KS

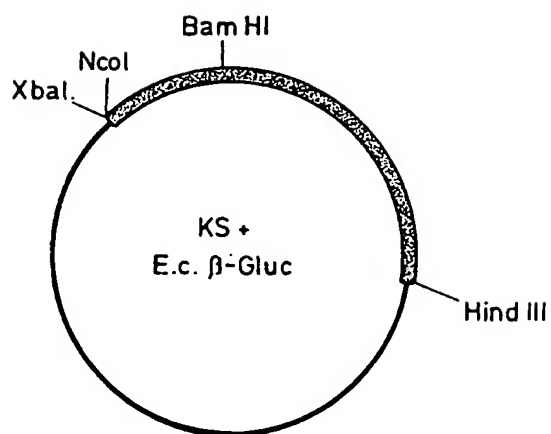


FIG. 2

Fab HC for: 5' GAA TTC CAT GGA ACC AGA ACC AGA ACC GAG CTC AAC TCT N2
link
CTT GTC CAC CTT GGT GTT 3'
C H 1

Fab HC back: 5' TCT AGA TAA CGA GGG CAA AAA ATG GAG GTC CAA CTG CAG N2b
S D V H
GAG AGC 3'

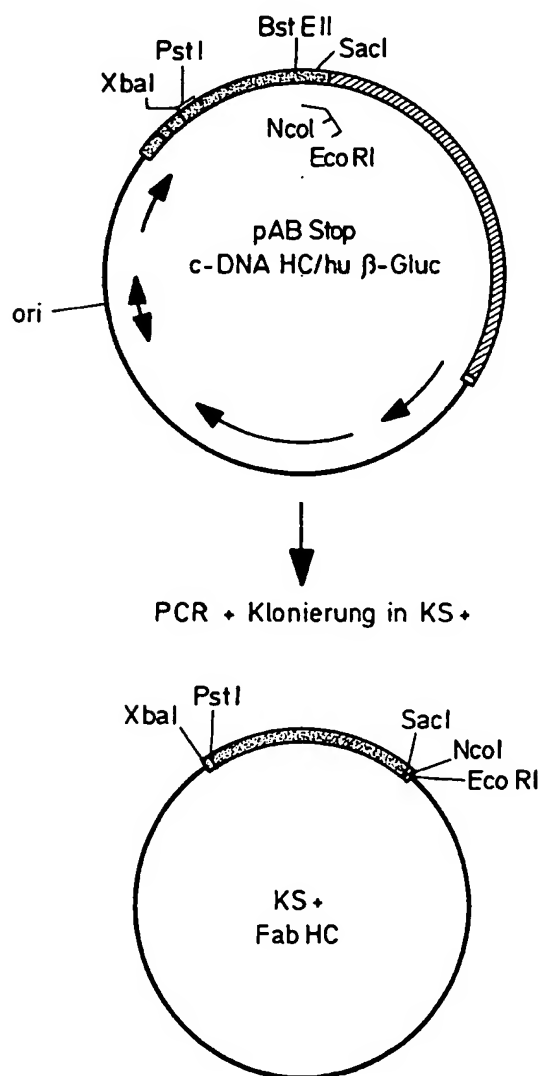


FIG. 3

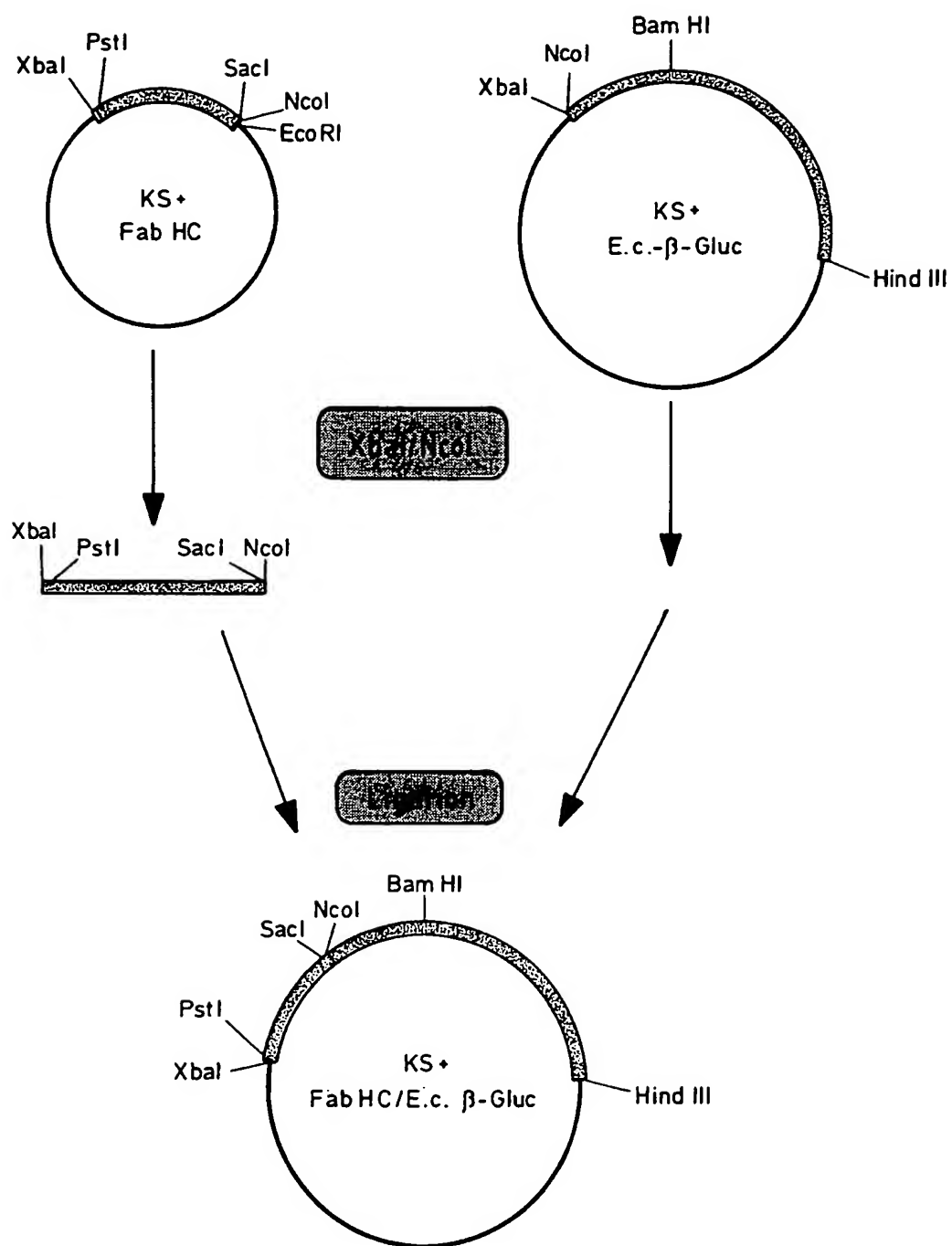
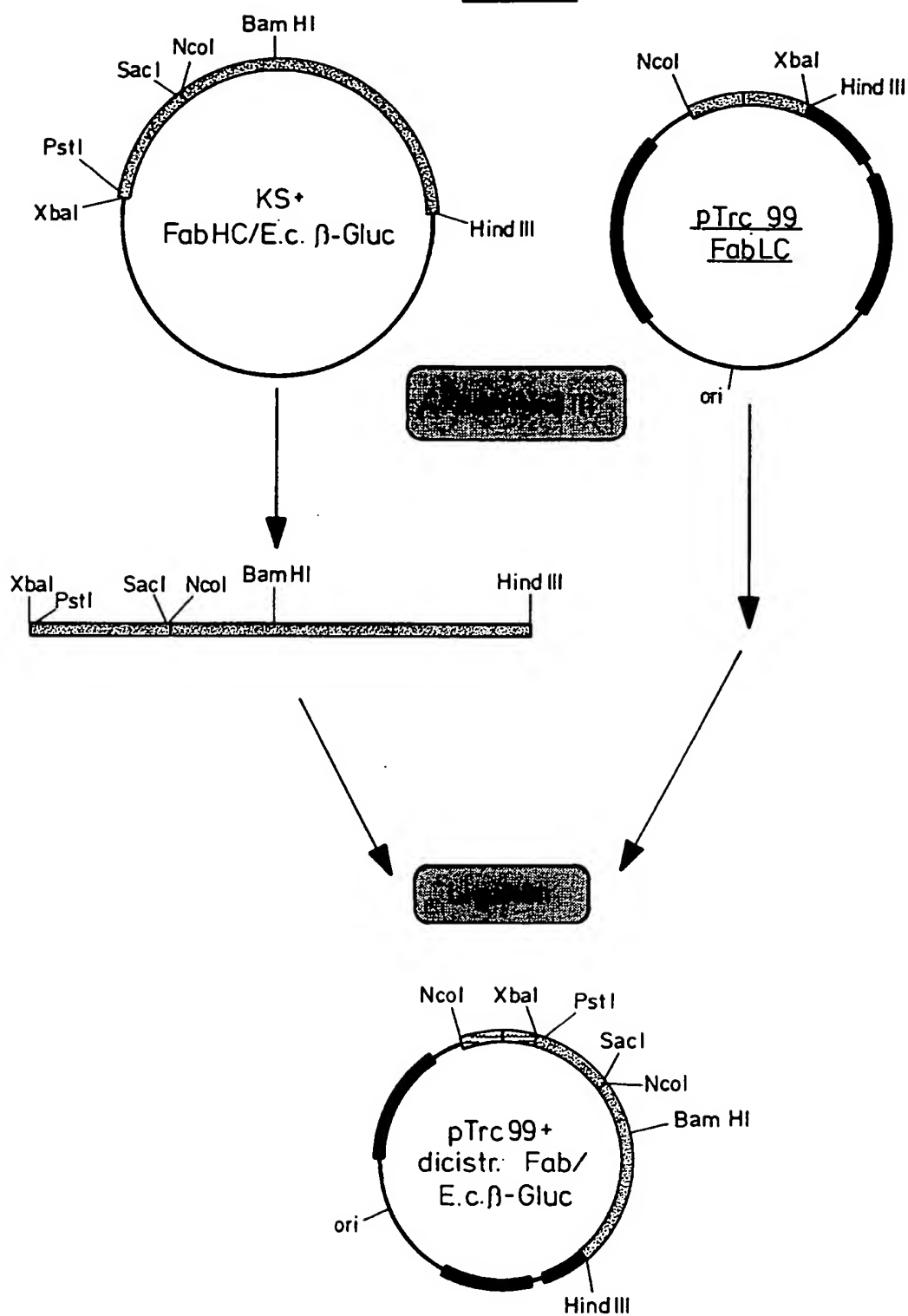
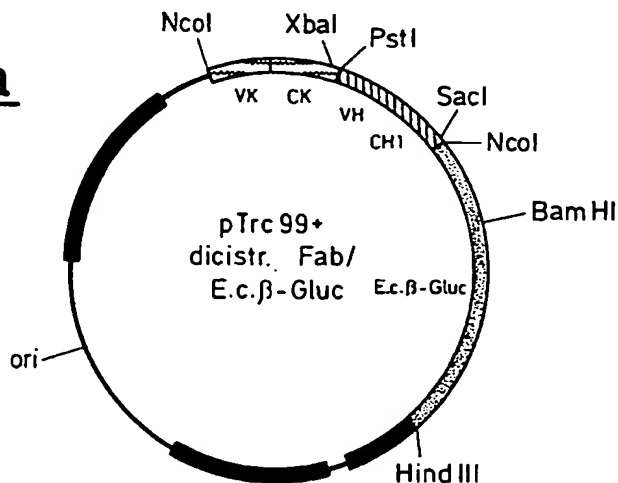


FIG.4



431/26 hum dicistr. Fab/E.c.β-Glucuronidase in pTrc 99

FIG.5a

NcoI

1 CC ATG GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA
1▶Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg N5

60 GTG ACC ATC ACC TGT AGT ACC AGC TCG AGT GTA ACT TAC ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG
20▶Val Thr Ile Thr Cys Ser Thr Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys

120 CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC AGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGT GTG CCA VK
40▶Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

180 AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG
60▶Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln

240 CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAT CAG TGG AGT AGT TAT CCC ACG TTC GCC CAA
80▶Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Thr Phe Gly Gln

300 GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA
100▶Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

360 TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT
120▶Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

420 CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG CK
140▶Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

480 GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG
160▶Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr

540 CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC
180▶Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

XbaI

600 CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG TCTAGATAACGAGGGCAAA
200▶Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys ...

PstI

664 AA ATG GAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG
1▶Met Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu

FIG. 5b

723 ACC CTG ACC TOC ACC GTG TCT GGC TTC ACC ATC ACC AGT GGT TAT ACC TGG CAC TGG GTG
 20 Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Gly Tyr Ser Trp His Trp Val

783 AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA TAC ATA CAG TAC AGT GGT ATC ACT
 40 Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Ile Thr

843 AAC TAC AAC CCC TCT CTC AAA AGT AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC ACC AAG AAC CAG
 60 Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln

903 TTC ACC CTG AGA CTC ACC ACC GTG ACA GGC GGC GAC ACC GCG GTC TAT TAT TGT GCA AGA
 80 Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

963 GAA CAC TAT CAT TAC CAC TCG TAC TTC GAT GTC TGG GGT CAA GGC AGC CTC GTC ACA GTC
 100 Glu Asp Tyr Asp Tyr His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val

1023 ACA GTC TCC TCA GCT TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG
 120 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1083 ACC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCG CTG GCG TCC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG
 140 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

1143 GTG ACC GTG TCG TGG AAC TCA GCG GCG CTG ACC ACC GCG GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC
 160 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

1203 CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC ACC ACC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC ACC TTG
 180 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

1263 GGC ACC CAG ACC TAC ACC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC ACC AAC ACC AAG GTG GAC AAG
 200 Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 link

1323 AGA GTT GAG CTC GGT TCT GGT TCT GGT TCC ATG GTA CGT CCT GTA GAA ACC CCA ACC CTT
 220 Arg Val Glu Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Met Val Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Arg

1383 GAA ATC AAA AAA CTC GAC GGC CTG TGG CCA TTC AGT CTG GAT CCC GAA AAC TGT GCA ATT
 240 Glu Ile Lys Lys Leu Asp Gly Leu Trp Ala Phe Ser Leu Asp Arg Glu Asn Cys Gly Ile

1443 GAT CAG CGT TGG TGG GAA ACC GCG TTA CAA GAA ACC CCG CCA ATT GCT GTG CCA GGC AGT
 260 Asp Gln Arg Trp Trp Glu Ser Ala Leu Gln Glu Ser Arg Ala Ile Ala Val Pro Gly Ser

1503 TTT AAC GAT CAG TTC GCC GAT GCA GAT ATT CGT AAT TAT CCG GGC AAC GTC TCG TAT CAG
 280 Phe Asn Asp Gln Phe Ala Asp Ala Asp Ile Arg Asn Tyr Ala Gly Asn Val Trp Tyr Gln

1563 CCC GAA GTC TTT ATA CCG AAA GGT TGG CCA GGC CAG CGT ATC GTG CTG CGT TTC GAT GCG
 300 Arg Glu Val Phe Ile Pro Lys Gly Trp Ala Gly Gln Arg Ile Val Leu Arg Phe Asp Ala

1623 GTC ACT CAT TAC GGC AAA GTG TGG GTC AAT AAT CAG GAA GTG ATG GAG CAT CAG GGC GGC
 320 Val Thr His Tyr Gly Lys Val Trp Val Asn Asn Gln Glu Val Met Glu His Gln Gly Gly

1683 TAT ACC CCA TTT GAA GGC GAT GTC ACC CCG TAT GTT ATT CCC GCG AAA AGT GTA CGT ATC
 340 Tyr Thr Pro Phe Glu Ala Asp Val Thr Pro Tyr Val Ile Ala Gly Lys Ser Val Arg Ile

1743 ACC GTT TGT GTG AAC AAC GAA CTG AAC TGG CAG ACT ATC CCG CCG GGA ATG GTG ATT ACC
 360 Thr Val Cys Val Asn Asn Glu Leu Asn Trp Gln Thr Ile Pro Pro Gly Met Val Ile Thr

1803 GAC GAA AAC GGC AAG AAA AAG CAG TCT TAC TTC CAT AAT TTC TTT AAC TAT GCC GCG ATC
 380 Asp Glu Asn Gly Lys Lys Lys Gln Ser Tyr Phe His Asn Phe Phe Asn Tyr Ala Gly Ile

1863 CAT CCG ACC GTA ATG CTC TAC ACC ACG CCG AAC ACC TGG GTG GAC GAT ATC ACC GTG GTG
 400 His Arg Ser Val Met Leu Tyr Thr Thr Pro Asn Thr Trp Val Asp Asp Ile Thr Val Val

1923 ACG CAT GTC GCG CAA GAC TGT AAC CAC CCG TCT GTT CAC TCG CAG GTG GTG GCG AAT CGT
 420 Thr His Val Ala Gln Asp Cys Asn His Ala Ser Val Asp Trp Gln Val Val Ala Asn Gly

VH

CH1

E.c. β -Gluc

BamHI

FIG.5c

1983 GAT GTC AGC GTT GAA CTG CGT GAT GCG GAT CAA CAG GTG GTT GCA ACT GGA CAA GGC ACT
 440► Asp Val Ser Val Glu Leu Arg Asp Ala Asp Gln Gln Val Val Ala Thr Gly Gln Gly Thr

2043 AGC GGG ACT TTG CAA GTG GTG AAT CCG CAC CTC TGG CAA CCG GGT GAA GGT TAT CTC TAT
 460► Ser Gly Thr Leu Gln Val Val Asn Pro His Leu Trp Gln Pro Gly Glu Gly Tyr Leu Tyr

2103 GAA CTG TGC GTC ACA GGC AAA AGC CAG ACA GAG TGT GAT ATC TAC CCG CTT CCG GTC GGC
 480► Glu Leu Cys Val Thr Ala Lys Ser Gln Thr Glu Cys Asp Ile Tyr Pro Leu Arg Val Gly

2163 ATC CCG TCA GTG GCA GTG AAG GGC GAA CAG TTC CTG ATT AAC CAC AAA CCG TTC TAC TTT
 500► Ile Arg Ser Val Ala Val Lys Gly Glu Gln Phe Leu Ile Asn His Lys Pro Phe Tyr Phe

2223 ACT GGC TTT GGT CGT CAT GAA GAT GCG GAC TTA CGT GGC AAA GGA TTC GAT AAC GTG CTG
 520► Thr Gly Phe Gly Arg His Glu Asp Ala Asp Leu Arg Gly Lys Gly Phe Asp Asn Val Leu

2283 ATG GTG CAC GAC CAC GCA TTA ATG GAC TGG ATT GGG GCC AAC TCC TAC CGT ACC TCG CAT
 540► Met Val His Asp His Ala Leu Met Asp Trp Ile Gly Ala Asn Ser Tyr Arg Thr Ser His

2343 TAC CCT TAC GCT GAA GAG ATG CTC GAC TGG GCA GAT GAA CAT GGC ATC GTG GTG ATT GAT
 560► Tyr Pro Tyr Ala Glu Glu Met Leu Asp Trp Ala Asp Glu His Gly Ile Val Val Ile Asp

2403 GAA ACT GCT GCT GTC GGC TTT AAC CTC TCT TTA GGC ATT GGT TTC GAA GCG GGC AAC AAG
 580► Glu Thr Ala Ala Val Gly Phe Asn Leu Ser Leu Gly Ile Gly Phe Glu Ala Gly Asn Lys

2463 CCG AAA GAA CTG TAC ACC GAA GAG GCA GTC AAC GGG GAA ACT CAG CAA GCG CAC TTA CAG
 600► Pro Lys Glu Leu Tyr Ser Glu Glu Ala Val Asn Gly Glu Thr Gln Gln Ala His Leu Gln

2523 GCG ATT AAA GAG CTG ATA GCG CGT GAC AAA AAC CAC CCA AGC GTG GTG ATG TGG AGT ATT
 620► Ala Ile Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asp Lys Asn His Pro Ser Val Val Met Trp Ser Ile

2583 GGC AAC GAA CCG GAT ACC CGT CCG CAA GGT GCA CCG GAA TAT TTC GCG CCA CTG GCG GAA
 640► Ala Asn Glu Pro Asp Thr Arg Pro Gln Gly Ala Arg Glu Tyr Phe Ala Pro Leu Ala Glu

2643 GCA ACG CGT AAA CTC GAC CCG ACG CGT CCG ATC ACC TGC GTC AAT GTA ATG TTC TGC GAC
 660► Ala Thr Arg Lys Leu Asp Pro Thr Arg Pro Ile Thr Cys Val Asn Val Met Phe Cys Asp

2703 GCT CAC ACC GAT ACC ATC AGC GAT CTC TTT GAT GTG CTG TGC CTG AAC CGT TAT TAC GCA
 680► Ala His Thr Asp Thr Ile Ser Asp Leu Phe Asp Val Leu Cys Leu Asn Arg Tyr Tyr Gly

2763 TGG TAT GTC CAA AGC GGC GAT TTG GAA ACG GCA GAG AAG GTA CTG GAA AAA GAA CTT CTG
 700► Trp Tyr Val Gln Ser Gly Asp Leu Glu Thr Ala Glu Lys Val Leu Glu Lys Glu Leu Leu

2823 GCC TGG CAG GAG AAA CTG CAT CAG CCG ATT ATC ATC ACC GAA TAC GGC GTG GAT ACG TTA
 720► Ala Trp Gln Glu Lys Leu His Gln Pro Ile Ile Ile Thr Glu Tyr Gly Val Asp Thr Leu

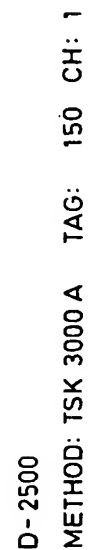
2883 GCC GCG CTG CAC TCA ATG TAC ACC GAC ATG TGG AGT GAA GAG TAT CAG TGT GCA TGG CTG
 740► Ala Gly Leu His Ser Met Tyr Thr Asp Met Trp Ser Glu Glu Tyr Gln Cys Ala Trp Leu

2943 GAT ATG TAT CAC CGC GTC TTT GAT CCG GTC ACC GGC GTC GTC GGT GAA CAG GTA TGG AAT
 760► Asp Met Tyr His Arg Val Phe Asp Arg Val Ser Ala Val Val Gly Glu Gln Val Trp Asn

3003 TTC GCC GAT TTT CCG ACC TCG CAA GGC ATA TTG CCG GTT GGC GGT AAC AAG AAA GGG ATC
 780► Phe Ala Asp Phe Ala Thr Ser Gln Gly Ile Leu Arg Val Gly Gly Asn Lys Lys Gly Ile

3063 TTC ACT CCG GAC CCG AAA CCG AAG TCG GCG GCT TTT CTG CTG CAA AAA CCG TGG ACT GGC
 800► Phe Thr Arg Asp Arg Lys Pro Lys Ser Ala Ala Phe Leu Leu Gln Lys Arg Trp Thr Gly

HindIII
 3123 ATG AAC TTC GGT GAA AAA CCG CAG CAG GGA GGC AAA CAA TGA AGCTT
 820► Met Asn Phe Gly Glu Lys Pro Gln Gln Gly Gly Lys Gln ...



12